



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-232485

(43)Date of publication of application : 16.10.1991

(51)Int.Cl.

C12N 5/18  
A61K 39/395  
A61K 39/395  
A61K 39/395  
G01N 33/53  
G01N 33/577  
// C12N 15/06  
C12P 21/08  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 02-337033

(71)Applicant : BIOTEST PHARMA GMBH  
CENTRE REG TRANSFUSION  
SANGUINE DE LILLE

(22)Date of filing : 30.11.1990

(72)Inventor : WIJDENES JOHN  
CLEMENT CLAUDE  
MOREL-FOURRIER BRIGITTE  
PETERS ANDRE  
KLOFT MICHAEL DR  
SEBALD WALTER  
SCHWULERA UDO DR

(30)Priority

Priority number : 89 3939706 Priority date : 01.12.1989 Priority country : DE

## (54) PRODUCTION OF HYBRIDOMA CELL LINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject plural cell lines capable of producing a monoclonal antibody for the treatment, etc., of interleukin-6 dependent diseases by fusing a cell of a mouse spleen immunized against interleukin-6 (IL-6) to a cell of a mouse myeloma, identifying and isolating cell lines from the fused cell and joining the fused cell to different sites of an antigen.

CONSTITUTION: A cell of a mouse spleen is immunized against interleukin-6 (IL-6) and then fused to a cell of a mouse myeloma to identify and isolate three different cell lines of a hybridoma cell line C.N.C.M. accession No.1/913 (BE-8), C.N.C.M. accession No.1/911 (BE-4) and a hybridoma cell line C.N.C.M. accession No.1/912 (BF-6). Thereby, the cell lines are capable of producing monoclonal antibodies recognizing the IL-6. As a result, a hybridoma cell line capable of producing monoclonal, antibodies binding to each of different epitopes on the IL-6 molecule according to the different cell lines are obtained.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-232485

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)10月16日

C 12 N 5/18  
A 61 K 39/395

ABA U 8829-4C  
ADU ※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全11頁)

⑭ 発明の名称 ハイブリドーマ細胞株の製造方法

⑮ 特 願 平2-337033

⑯ 出 願 平2(1990)11月30日

優先権主張 ⑰ 1989年12月1日 ⑱ 西ドイツ(DE) ⑲ P3939706.8

⑳ 発 明 者 ジョン ウィユデネス フランス国ジエネイル, リュ ドウ コトウ オクソン-  
テサス(番地なし)

㉑ 出 願 人 バイオテスト ファル ドイツ連邦共和国ドライアイツヒ, ラントシュタイネルシ  
マ ゲゼルシャフト ユトラーセ 5  
ミット ベシユレンク  
テル ハフツング

㉒ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

ハイブリドーマ細胞株の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) マウスの免疫化脾細胞をマウス骨髓腫細胞と融合することによるハイブリドーマ細胞株の製造方法において、脾細胞を融合に先立ってインターロイキン-6に対して免疫にし、融合細胞から三種の異なる細胞株、即ちC. N. C. M. 寄託番号1/913(BE-8)のハイブリドーマ細胞株、C. N. C. M. 寄託番号1/911(BE-4)及びC. N. C. M. 寄託番号1/912(BF-6)のハイブリドーマ細胞株を同定、単離し、これらの細胞株がヒトインターロイキン-6を認識するモノクローナル抗体を産生し、異なる細胞株に応じてインターロイキン-6分子上の異なるエピトープに各々結合するものであることを特徴とする製造方法。

(2) ハイブリドーマ細胞株がX63Ag8653ネズミ骨髓腫細胞により得られることを特徴と

する特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) モノクローナル抗体がヒトインターロイキン-6に対して特異的な結合作用を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(4) 細胞株BE-4とBE-8により産生された抗体がヒトの細胞及びネズミの細胞のインターロイキン-6受容体に結合し得ることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(5) モノクローナル抗体がキメラを形成し、一定部がヒトIgからなり、可変部、特に超可変部がネズミIgからなることを特徴とする特許請求第1項記載の方法。

(6) モノクローナル抗体が毒素及び(又は)化学療法剤に結合していることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

(7) インターロイキン6依存性疾患、特に腫瘍疾患、自己免疫疾患、あらゆる感染症、急性期応答障害の治療、予防及び診断のための、特許請求の範囲第1項記載の方法により得られたモノクローナル抗体の使用。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は三種の新しいハイブリドーマ細胞株の製造及びそれにより産生されたモノクローナル抗体であってヒトインターロイキン-6を認識又はインターロイキン-6の作用を阻害するものに関する。

本発明はまた、これらモノクローナル抗体の、治療目的及び診断目的のための使用に関する。

インターロイキン-6 (IL-6) はもともとヒトB細胞刺激因子2 (BSF-2) (M. Kawano, T. Hiranoら、Nature、332巻、3号、83～85頁、1988年) 又はハイブリドーマ成長因子 (HGF) (R. BazinとR. Lemieux、J. Immunol.、139巻、78号、87頁、1987年) ともいわれ、細胞性免疫系の媒介物に属する。

IL-6をコードするcDNAの配列とそれ由来するアミノ酸配列 (184個のアミノ酸) は文献に記載されている (T. Hiranoら、Nature、324巻、6号、73～76頁、1

in-6)。

編者P. B. Sehgalら、The New York Academy of Sciences、2、East 63rd Street、New York、U-S-A及びI. Andusら、DMW、44巻、1989年。

上記の文献は、様々な症候群の形成とそれらの進行におけるIL-6の重要性ならびに血液学的腫瘍、固形腫瘍、自己免疫疾患、炎症過程、ウィルス感染、細菌感染、糸状菌感染、急性期応答障害及びリンファインカスケードへの影響におけるIL-6拮抗因 (IL-6抗体) による影響をまとめている。

さらに、IL-6の病態生理学的役割については文献に非常に多くの例が見られるが、ここではそのうちのほんの数例のみを引用している。

たとえば、C. P. ChinとF. Lee (J. of Immun.、142巻、1909～1915頁、1989年) は骨髓白血病細胞の増殖と分化の調整におけるIL-6の役割について記載

98…)。

インターロイキン-6 (IL-6) が広い生物学的機能スペクトルを有することは知られている。T細胞 (R. D. Gormanら、Proc. Natn. Acad. Sci. USA、84巻、7629～7633頁、1987年)、形質細胞腫 (J. van Dammeら、J. Exp. Med.、165巻、914～919頁、1987年)、肝細胞 (T. Andusら、FEBs Lett.、221巻、18～22頁、1987年) 及び繊維芽細胞 (M. Kohaseら、Cell、45巻、659～666頁、1986年) に対するインターロイキン-6の効果はそれぞれの文献に明瞭に記載されている。

IL-6とIL-6拮抗因の役割は以下の総説に記載されている。

「急性期免疫応答の調整 (Regulation of the acute phase and immune responses)」

「インターロイキン-6 (Interleuk

in-6)。

P. A. Guerneら (J. Clin. Invest.、83巻、585～592頁、1989年) は、特に高い濃度のIL6が関節炎患者に見出され、明らかにこれらの症候群の進行に重要な役割を演じていることを示している。

C. E. Hack (Blood、74巻、No 15、1704～1710頁、1989年) は、インターロイキン-6が敗血性ショックの病態生理学において重要な役割を果たすことを最初に示した。彼らはその研究中、敗血性ショックの患者の大多数に、対照集団に比べてIL-6濃度の大きな上昇が見られることを発見したのである。全身性狼瘡紅斑患者のIL-6濃度についての研究で、A. J. G. Swaakら (Rheumatol. Int.、8巻、263～268頁、1989年) はIL-6の量と急性期タンパク応答との間の相関性を見出した。これらの研究及び他の研究により、IL-6はおそらく肝細胞による急性期タンパクの産生誘導の原因となっているであろう

ことが示されている。

キャッスルマン(Kastleman's)症候群はリンパ球異常増殖、形質細胞浸潤、熱、貧血、高 $\gamma$ グロブリン症を特徴とする疾患である。T. Nishimotoら(Blood、4巻、1360~1367頁、1989年)は、この疾患において血清中のIL-6濃度と疾患の臨床的態様との間に明瞭な相関関係があり、IL-6を様々な臨床的徴候の発生にとって重要な要素として考えなければならないことを示すことができた。

T. Kishimoto(FEBs Lett.、250巻、607~610頁、1989年)をめぐる同じ研究集団は、IL-6が腎臓細胞癌腫の自己分泌増殖因子であり、これら腫瘍細胞の増殖を抗IL-6抗血清により阻害し得ることを示すことができた。骨髓腫細胞の決定的増殖因子としてのIL-6の役割は多くの研究集団によって研究されている。

X. G. Zhangら(Blood、74巻、11~13頁、1989)は、in vitro

またこのような抗体を産生し得る細胞が寄託されているわけでもない。この点で再現性のある教示がされているわけではない。つまり、このPCT公報の開示は純粋に推論的な考察にすぎないのである。

本発明の目的はIL-6依存性細胞の増殖を効率的に阻害又は抑制することのできるモノクローナル抗体を調製することである。これらのモノクローナル抗体は治療的にも予防的にも低用量で使用するができ、処置の間も何らの二次的効果も生じないのである。

この目的は、C. MilsteinとG. Köhlerにより開発された公知の融合法を使用し、IL-6に対するマウスモノクローナル抗体を産生する新しいハイブリドーマ細胞株を単離することにより達成される。

BE-4(IgG2b)、BE-8(IgG1)及びBF-6(IgG1)とそれぞれ呼ばれるこれらの細胞株は、French National Collection for Mic

での骨髓腫細胞のIL-6応答がin vivoでの増殖状態と、従って疾患の重さと直接相関関係があることを示すことができた。

L. Berginら(J. Exp. Med.、170巻、613~618頁、1989年)は、IL-6が悪性の成熟細胞に作用するだけでなく、多発生骨髓腫における悪性形質細胞前駆体の増殖と分化を促進することを示すことができた。

T. Kishimotoら(Nature、332巻、83~85頁、1988年)は、IL-6依存性骨髓腫細胞の増殖を抗IL-6抗体で阻害し得ることを初めて実験的に証明することができた。

PCT公報WO88/00206には、IL-6の調製と使用が記載されており、公知の方法においてIL-6を使用すればポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が得られることも指摘されている。しかしながら、このような抗体の調製法は記載されていない。同様に、化学的・物理的パラメータで抗体が定義されているわけではなく、

roorganisms(CNCM)に、それぞれI/911、I/913及びI/912という番号で寄託されており、これらからマウス免疫グロブリンのクラス変換した変種を単離することができる。たとえば、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG1及び他の免疫グロブリンクラスなどである。

モノクローナル抗体BE-4とBE-8はヒト及びマウス細胞株上のIL-6受容体への結合に対して、IL-6と競合し、IL-6依存性細胞株の増殖を阻害する。

両抗体ともに受容体に結合しているIL-6を認識することができ、またBE-4とBE-8はIL-6分子上の異なるエピトープを認識するものであることが示されている。

モノクローナル抗体BF-6も同様にIL-6を認識するが、IL-6受容体への結合をIL-6と競合するものではなく、またIL-6依存性細胞の増殖を阻害し得るものでもない。BF-6は受容体に結合しているIL-6を認識する能力

を有しており、BE-4とBE-8により認識されるエピトープとは異なるエピトープを認識するものであることが示されている。

それ故、このモノクローナル抗体は多発性骨髄腫、骨髄性白血病、キャッスルマン症候群、全身性狼瘡紅斑、腎臓細胞癌腫、関節炎のような疾患、及びIL-6依存性であることが示されている他の疾患の治療に適している。

このモノクローナル抗体は、純物質として、毒素(たとえばリシンA又はサポリン)もしくは放射性物質もしくは他の薬物に結合して、又はリポソーム中にカプセル化して使用してもよい。

抗体BE-4、BE-8又はBF-6を含有する薬物は液状又は凍結乾燥状にしてもよい。安定化のためにタンパク、糖、糖アルコール、アミノ酸及び粘度増強剤を使用してもよく、また緩衝化のために無機酸、好ましくは生理学的媒体(PBS pH7.4)中リン酸ナトリウムを使用してもよい。

この抗体は治療目的のために0.5~5 mg/ml、

本発明を以下の例により詳細に説明する。

#### 1. モノクローナル抗体の調製

##### 実施例1 免疫化、融合、クローニング及びモノクローナル抗体BE-4、BE-8及びBF-6の回収

雌Balb/cマウスを2週間おきに4回、各回10 µgの組換えIL-6を腹腔内投与して免疫化した。4回目の免疫化は静脈内投与により行い、脾細胞を4日後に抽出し、融合した。融合は次のようにして行った。

免疫化した脾細胞をX63Ag8653ネズミ骨髄腫細胞と5:1の比率でポリエチレングリコールの存在下で融合した(Kearneyら、J. of Immunol.、123巻、1548頁、1978年)。この細胞株はthe European Collection of Animal Cell Cultures(ECA CC)、PHLS Centre for Applied Microbiology and Research、Porton Down、

好ましくは1 mg/mlの濃度で使用され、概して全身的に投与されるが、局所的な投与も排除されるものではない。

モノクローナル抗体BE-4、BE-8及びBF-6は同様に、受容体、細胞表面又は体液中のIL-6を同定するための診断薬として用いることもできる。このような使用においては、抗体は蛍光物質等に結合していてもよい。同様に体液中のIL-6を測定するためのELISA又はラジオイムノアッセイにこの抗体を用いることもできる。

本発明に係るモノクローナル抗体は、これを出発として、ヒト起源(ヒト免疫グロブリン)の一定ドメイン、ネズミ起源(ネズミ免疫グロブリン)可変領域、特に超可変領域のみとのキメラ抗体を製造するのに適している。IL-6依存性疾患の治療のためには、このキメラは純物質として、あるいは毒素、放射性物質、他の薬物に結合して、もしくはリポソーム中にカプセル化して使用してもよい。

Salisbury、Wiltshire、SP4 OJG、UKに、EACC No 850 114 20の下で寄託されている。

融合細胞懸濁液を一回洗浄し、選択培地中で培養した(RPMI 1640、10%熱不活化ウマ血清、4 mMグルタミン、ヒポキサンチン13.6 mg/l、アミノプテリン0.17 mg/l及び10 µg/mlインシュリン)。

10日後、ハイブリドーマ増殖を示した培養の融合上澄液の抗IL-6モノクローナル抗体の産生をテストした。

この目的のため、100 µlのハイブリドーマ上澄液を、あらかじめ1000 ngの抗マウス免疫グロブリンにより4℃で一晩被覆したELISAプレートで、1時間インキュベートした。

個々のウェルを3回洗浄後、各々100 mlのPBS中100 ngのビオチン化したIL-6を用いて室温で1時間インキュベートした。再び3回洗浄後、ストレプトビジン パーオキシダーゼとの反応を室温で1時間行い、もう一度洗浄して、

基質 (DPO) とのインキュベーションを行った。その後プレートの 405 nm での光学濃度を測定した。陽性のクローンを、限定希釈法 (シーディング (seeding) 密度 0.2 細胞/培養) を用いた 4 段階のクローニングの後に調べ、クローン BE-4、BE-8 及び BF-6 を単離した。BE-4 はマウス IgG2b 抗体、BF-6 と BE-8 は IgG1 抗体であり、いずれも k (カッパ) L 鎖を有しており、組替え IL-6 への顕著な結合を示すものである。

#### 実施例 2 抗体 BE-4、BE-8 及び BF-6 の in vivo 産生と精製

抗 IL-6 モノクローナル抗体 BE-4、BE-8 及び BF-6 は Balb/c マウスに BE-4、BE-8 及び BF-6 ハイブリドーマ細胞をそれぞれ腹腔内注射することにより、in vivo で大量に産生された。ハイブリドーマ細胞注射の一週間前に、0.5 ml のフロインドの不完全補助液をマウスの腹腔に注入した。ハイブリドーマ細胞注射の 8~14 日後に腹水を抽出することが

できた。

硫酸アンモニウム (45% 飽和) により腹水からモノクローナル抗体を沈殿させ、0.02 mM Tris (pH 7.7) で再緩衝させ、Q-セファロースカラムに結合させた。このカラム上でモノクローナル抗体を 0.02 mM Tris (pH 7.7) 中 1% Tween 20 で洗浄した後、0.35 M NaCl 溶液 (pH 7.7) でカラムから溶離させた。

治療の目的でモノクローナル抗体を生理的 PBS 緩衝液 (リン酸緩衝食塩水) で再緩衝させた。

#### II. モノクローナル抗体 BE-4、BE-8 及び BF-6 の生物活性

#### 実施例 3 IL-6 依存生細胞株 B9 の IL-6 誘導増殖の BE-4、BE-8 及び BF-6 による阻害

細胞株 B9 は IL-6 に依存したマウスハイブリドーマ株であり、その性質は L. A. van Aarden により記載されている (Eur. J. Immunol., 17 巻、1411 頁、1987 年)。

細胞株 B9 を RPMI 1640 中で、10% ウシ胎児血清とメルカプトエタノールとともに、1 ml あたり 2 pg の IL-6 を添加して 3 日間培養する。その後 16 時間の間、 $H^3$ -チミジンを添加する。その後細胞を集め、洗浄し、ベータカウンターで測定する。

以下の実験では、1 ml あたり 2 pg の IL-6 を添加するとともに、様々な濃度の抗体 BE-4、BE-8 及び BF-6 も添加した。DNA 合成は、細胞増殖又は細胞阻害の指標としての  $H^3$ -チミジン取込みとして放射活性を検出することにより測定した。

測定した放射活性 (cpm)			IL-6(2pg/ml)
BE-4	0	6910	115976
	1 pg	7552	91601
	10 pg	7881	28247
	100 pg	7941	15384
	1 ng	9055	8326
	10 ng	8178	4860
	100 ng	7611	5327
BE-8	1 μg	6992	4315
	0	8916	136217
	1 pg	9002	64500
	10 pg	8225	28002
	100 pg	8264	16259
	1 ng	9027	8281
	10 ng	8356	5629
BP-6	100 ng	9221	5434
	1 μg	10836	7470
	0	7488	126167
	1 pg	8050	131178
	10 pg	8366	116380
	100 pg	9118	118153
	1 ng	7673	124812
	10 ng	7987	119631
	100 ng	8855	115186
	1 ng	9412	117318

cpm = 1分あたりの壊変、2回の測定の平均値

この結果は明らかに、細胞増殖の指標としてHチミジンの取込み、従ってDNA合成が、BE-4及びBE-8を用いるとテストしたB9培養よりも幾分低いことを示している。これらの抗体は細胞株B9のIL-6依存性増殖を阻害するが、BF-6は細胞株B9の増殖を阻害することはない。

#### 実施例4 スカッチャード (Scatchard) 分析: 細胞株U226に対するIL-6の親和性定数の決定

IL-6のヨウ素化:

10 μgのホウ酸緩衝液 (0.1 M、pH 8.0) 中5 μgのIL-6を1 mCiの<sup>125</sup>I (Amersham社のBolton and Hunter試薬、コードIM586) とともに0℃で15分間インキュベートした。次に反応を500 μgのグリシン (0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中0.2 M) を用いて5分間で停止した。

遊離<sup>125</sup>Iと結合<sup>125</sup>Iを、あらかじめPBS 1%ウシアルブミンで平衡にしておいたPD10

カラム (ファルマシア社製、G-25) に通して分離した。1 ngのIL-6の比活性は10320 cpmであった。

1カップあたり $2.5 \times 10^4$ 個のU226株の細胞を、様々な濃度の<sup>125</sup>I-IL-6と500倍過剰の非標識IL-6とともに、総体積1 mlのPBS 1%中4℃で90分間インキュベートした。その後3回洗浄の後、測定を行った。



IL-6 μl	結合 cpm	IL-6 ng	総 IL-6 ng	遊離 IL-6 ng	結合 IL-6 遊離 IL-6
0.1	1900	0.01957	0.33	0.3104	0.063
0.2	3000	0.03914	0.66	0.6208	0.063
0.4	7500	0.07725	1.32	1.2427	0.063
1	16000	0.1640	3.33	3.166	0.052
2	29000	0.2987	6.66	6.3613	0.047
4	48000	0.4944	13.2	12.705	0.039
10	84000	0.8652	33	32.134	0.027
20	114000	1.1742	66	64.825	0.018
40	132000	1.3596	132	130.640	0.010

(0.33 ng) の放射標識 IL-6 に添加したところ、非特異的結合に対する値として 253cpm が観測された。これから 3016 cpm という値が特異的結合の 100% に相当することがわかる。

1 μg/ml の BE-4、BE-8 又は BF-6 を添加した他は同様の実験を放射標識 IL-6 を用いて行ったところ、次の値が得られた。

BE-4 : 11% IL-6 結合

BE-8 : 14% IL-6 結合

BF-6 : 92% IL-6 結合

この実験は明らかに、BE-4 と BE-8 は IL-6 の受容体に対してその特異的結合を阻害することができるが、BF-6 はこの結合を阻害できないことを示している。

実施例 6 : 抗体 BE-4、BE-8 及び BF-6 のスカッチャード分析

各々について 40 mg の精製モノクローナル抗体を 180 μl の PBS 中で Na<sup>125</sup>I (0.5mCi) とインキュベートした。その後、10 ml (0.4 mg/ml) のクロラミン T を添加し、1 分後に 10 μl

結合 IL-6 (最大) : 1.5 ng

$0.057 \times 10^{-12}$  mMoI

$$KD : \frac{0.057 \times 10^{-12}}{0.063} = 8.7 \times 10^{-10} M$$

一細胞当たりの受容対数

$$\frac{0.057 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{11}}{2.5 \times 10^4} = 13680$$

スカッチャード分析により、細胞株 U226 については KD 値は  $8.7 \times 10^{-10} M$  であり、一細胞あたりの受容体数は 13680 であることが示された。

実施例 5 : 放射標識をした IL-6 と BE-4、

BE-8 及び BF-6 との間の受容体

競合の研究

1 ウェルあたり  $2.5 \times 10^4$  個の U226 細胞を 0.1 μl (0.33 ng) の放射標識 IL-6 とインキュベートし、陽性の対照とした。cpm 計数は  $3269 \pm 156$  であり、これを IL-6 の全結合に対する値とした。

500 倍過剰の非標識 IL-6 を 0.1 μl

の亜硫酸水素ナトリウム (0.5 μg/ml) を添加して反応を停止した。このように標識したモノクローナル抗体を遊離ヨウ素からクロマトグラフィー (セファデックス G-25) により分離した。

スカッチャード分析では、<sup>125</sup>I-BE-4、<sup>125</sup>I-BE-8 及び <sup>125</sup>I-BF-6 を ELISA で用いた。即ち、

(イ) 1 カップあたり 1000 ng の BE-4 又は BF-8 又は BF-6 でプレート を 4℃ で一晩インキュベートし、

(ロ) その後 PBS 5% アルブミンで飽和を行い、

(ハ) その後 10 ng の IL-6 により 4℃ で 2 時間インキュベーションを行った後、

様々な濃度のヨウ素化抗体及び、ある濃度に対してはまた、一連の非標識抗体をも 4℃ で 90 分間インキュベートし、

(ニ) 3 回洗浄して測定を行った。

U226 細胞株を用いた測定は次のようにして行った。

ヨウ素化IL-6の代わりに、10個<sup>6</sup>の細胞あたり20ngという一定量のIL-6を用いた他は実施例4と同様にインキュベーションを37℃で30分間行った後、様々な濃度のヨウ素化モノクローナル抗体を添加して4℃で60分間インキュベートした。

## 結果

## 比活性

BE-4 1ng=4664cpm

BE-8 1ng=4571cpm

BF-6 1ng=4510cpm

結合モノクローナル抗体	標識痕跡モノクローナル抗体	KD	IL-6分子
BF-6	BE-4	$0.8 \times 10^{-9}M$	15180
BE-4	BF-6	$2.7 \times 10^{-9}M$	15168
BE-4	BE-8	$0.1 \times 10^{-9}M$	14802
	UL266 IL-6+抗体		U266 受容体数
BE-4	$3.9 \times 10^{-9}M$		11733
BF-6	$4.7 \times 10^{-9}M$		27168
BE-8	$2.5 \times 10^{-9}M$		13425

をELISAプレートに結合させた。その後、プレートをPBS5%アルブミンで飽和させ、4回洗浄した。放射標識したBE-4、BE-8及びBF-6をそれぞれ異なる実験において添加し、インキュベートした。さらに、各放射標識抗体をまた1倍、10倍、100倍過剰の非標識抗体でインキュベートした。

ELISAスカッチャードは、全抗体について、この系で結合したIL-6は同一の濃度を示している。即ち、得られたKD値は合理的な値を示している。

細胞株はU266上の受容体に結合したIL-6のKD値はELISAで得られた定数と異なっている。これは受容体に結合した後はIL-6の三次元構造に若干の変化が起こることにより説明される。

BE-4とBE-8がBF-6よりも受容体結合IL-6の識別に劣るという発見は、BE-4とBE-8とは分子上の活性部位を同定し、受容体でのIL-6ダイマーしか認識できないが、BF-6はダイマー形状は別としてモノマー形状を認識することができるということで説明することができる。

#### 実施例7: BE-4、BE-8及びBF-6間の競合実験

炭酸塩緩衝液(pH9.5)中で4℃で一晩インキュベートすることによりIL-6(1μg/cup)

	BE-4 [125I]	BE-8 [125I]	BF-6 [125I]
	8535 cpm	9852 cpm	6514 cpm
BE-4 非標識	1倍 3597	100倍 315	100倍 6511
	10倍 1060	10倍 9518	10倍 5621
	100倍 8330	1倍 10517	1倍 6925
BE-8 非標識	10810	256	5974
	8330	983	4873
	7077	4276	5035
BF-6 非標識	8654	9518	1130
	10448	8952	3447
	8774	9328	703

この実験は各抗体はそれ自身とのみ競合するだけであって、BE-4、BE-8及びBF-6の間に置換がないことを示している。これは三種の抗体すべてが異なるエピトープを有していることを意味している。

実施例 8 : IL-6 の測定のためのサンドイッチ ELISA

(イ) BE-8 (1000 ng/cup/100  $\mu$ l) により 4℃で一晩飽和し、

(ロ) PBS 5% アルブミンにより室温で 90 分間飽和し、

(ク) ヒト血清中での様々な濃度の IL-6 とともに 37℃で 2 時間インキュベートし、

(ニ) ビオチン化 BE-4 (6.5  $\mu$ g/cup 100  $\mu$ l、PBS、Tween 0.5%) により室温で 90 分間インキュベートし、

(ホ) 基質を添加し、測定した。

キュベートした。

	cpm			
IL-6 U/ml	0.15 $\mu$ g/ml	0.08 $\mu$ g/ml	0.04 $\mu$ g/ml	0 $\mu$ g/ml BE-8
40	764	10213	56432	78421
20	119	110	7237	77610
4	222	280	594	73197
2	212	206	256	61040
1	196	224	230	38859

I U IL-6 : 50% 最大増殖を誘起させるのに必要な IL-6 の量

抗体 BE-4 についても同一の結果が得られた。これらの結果は IL-6 依存性ヒト細胞株 GB 上における BE-8 及び BE-4 による天然 IL-6 (ヒトリンパ球由来) の著しい阻害を示している。

Ⅲ. BE-4 を用いた初期的臨床結果

最終段階の多発性骨髄腫と診断され、2 日で 1 ml あたり 50,000 ~ 100,000 個の割合

ng IL-6/cup/100ml	光学濃度
100	1.807
10	1.566
1	1.356
0.5	0.921
0.25	0.573
0.125	0.401
0.062	0.311
0.031	0.212
0.015	0.190
0.008	0.195
0.004	0.170

バックグラウンド : 光学濃度 0.150

テストの感度は血清中 0.3 ng/ml の IL-6 である。

実施例 9 : 抗体 BE-4 及び BE-8 による

IL-6 依存性ヒト細胞株 GB の阻害

1 カップあたり  $2 \times 10^6$  個の GB 株の細胞を、様々な濃度の天然 IL-6 と様々な濃度の抗体 BE-8 とともに H<sup>2</sup>-チミジンを添加して 5 日間イン

で形質細胞腫細胞の数が増加していく患者を精製 BE-4 で処置した。

投与量は全 4 日にわたり 1 日あたり 10 mg (全投与量 : 40 mg) であった。抵抗は、1% ヒトアルブミンの食塩水溶液中 1 mg/ml の濃度で 30 分間注入された。治療中いかなる副作用も見られなかった。

臨床的所見 : 熱が急速に下がり通常の体温に戻った。最初の投与後すぐに全患者とも重病感が消失した。

血液学的所見 : 腫瘍塊 (形質細胞腫細胞) が最初の注入後ただちに減少し、細胞数が 1 ml あたり 100,000 個から 1 ml あたり 40,000 個になり、全処置期間を通して安定していた。

S 相 (前分裂相) における細胞数は処置により 30% から 10% に減少した。

これらの初期的臨床結果は多発性骨髄腫疾患の最終段階にある患者について得られた。そのため、

疾患の初期的段階で処置をすれば、腫瘍塊は他の処置の可能性（たとえば骨髄移植）が表われるほどに減少し得ることが期待できる。

今日までにこれらの患者のための有望な治療法は得られていないので、IL-6に対するモノクローナル抵抗を用いた治療は、この致命的な疾患の治療に新風をもたらすものであろう。

異なるエピトープを認識し、ともにIL-6の活性を阻害する抗体BE-4とBE-8を組合せて処置することにより、一層の改良が得られるであろう。

あるいは、抗体BE-4、BE-8及びBF-6は毒素と結合させることもでき、これによりIL-6活性のブロックとは別に、形質細胞腫をその細胞上の受容体へIL-6を固定することにより破壊することが可能となる。

代理人 浅 村 皓

# 第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 39/395	ADX	
G 01 N 33/53	P	7906-2G
33/577	B	9015-2G
// C 12 N 15/06		
C 12 P 21/08		8214-4B
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑦発 明 者	クロード クレメン	フランス国グレイ, エセルテンヌ (番地なし)
⑦発 明 者	ブリギツテ モレルー フーリアー	フランス国ベサンソン, リュ レオナール デ ビンシ 2
⑦発 明 者	アンドレ ビーターズ	フランス国ベサンソン, プラス ジャン コルネ, 2
⑦発 明 者	マイクル クロフト	ドイツ連邦共和国ダルムスタット, グラインシュトラーセ 18
⑦発 明 者	ヴァルター セバルト	ドイツ連邦共和国ヴュルツブルグ, メイヤー-オルベルス レベン-シュトラーセ 5
⑦発 明 者	ウド スクウレラ	ドイツ連邦共和国ハーナウ 1, クレプスバックスベグ 23
⑦出 願 人	サントル レジオナ ル ド トランスフュ ージオン サンクイー ヌ	フランス国 バサンゴン セデックス, プールパール ア ー, フレミング 1

手 続 補 正 書 (自発)

平成 3 年 1 月 31 日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

平成 2 年特許願第 337033 号

2. 発明の名称

ハイブリドーマ細胞株の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 バイオテスト ファルマ ゲゼルシャフト  
ミット ペシュレンクテル ハフツング

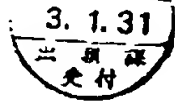
4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号  
新 大 手 町 ビ ル デ ィ ング 331  
電 話 (3211) 3 6 5 1 (代 表)

氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正の対象

明 細 書



6. 補正の内容

別紙のとおり

明細書の浄書 (内容に変更なし)